Vergleichende serologische Untersuchungen über Beziehungen zwischen verschiedenen Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämmen

Sevim Güneri

1960

Aus dem Institut für Mikrobiologie und
Infektionskrankheiten der Tiere
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Vorstand: Prof. Dr. A. M a y r

VERGLEICHENDE SEROLOGISCHE UNTERSUCHUNGEN ÜBER BEZIEHUNGEN ZWISCHEN VERSCHIEDENEN MUCOSAL DISEASE (VIRUSDIARRHOE-)-VIRUSSTÄMMEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von

Sevim Güneri

aus

Ankara/Türkei

München 1968

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof.Dr. J. K a l i c h

Referent: Prof. Dr. A. M a y r

Korreferent: Prof. Dr. H. S e d l m e i e r

Tag der Promotion 29. 2. 1968

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: UNI-Druck, München 13

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A) EINLEITUNG 1

B) SCHRIFTTUM 2

1. Einführung 2

2. Biologische Eigenschaften des Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus 3

3. Morphologische, chemisch-physikalische und antigene Eigenschaften des Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus 4

4. Serologische Beziehungen zwischen verschiedenen Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämmen 5

5. Immunisierende Eigenschaften des Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus 7

6. Beziehungen des Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus zum Virus der klassischen Schweinepest 8

C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN 10

I. Material und Methoden 10

1. Virusstämme 10

2. Gewebezüchtung 11

3. Antigenherstellung 11

4. Herstellung von Kaninchen-Immunseren 12

5. Virustitrationen 12

6. Technik der Neutralisationsteste 13

7. Bakteriologische Prüfung 14

II. Versuche und Ergebnisse 15

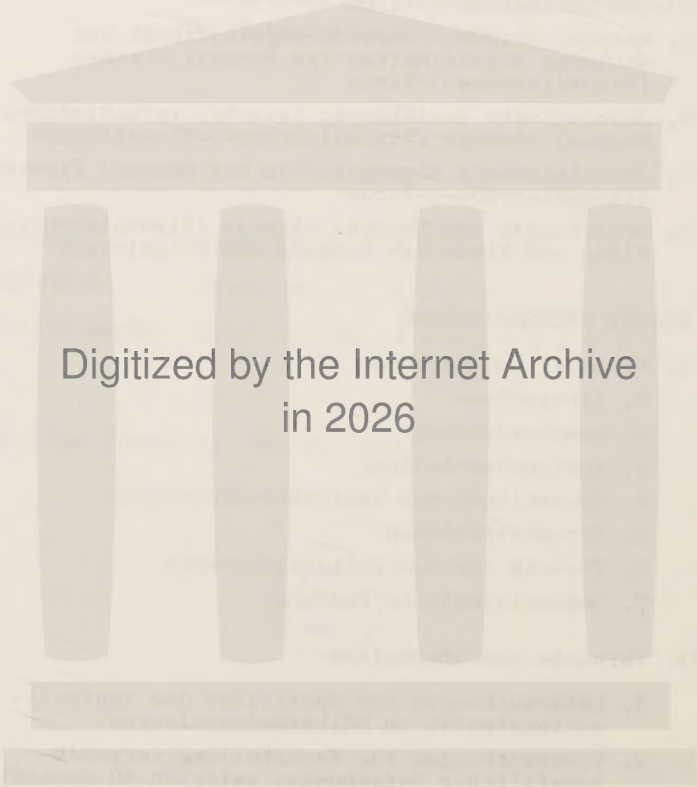
1. Untersuchungen zur Spezifität des Neutralisationstestes in Kälberhodenkulturen 15

2. Untersuchungen zur Feststellung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen 10 Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämmen im Kreuzneutralisationstest 15

D) BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE 21

E) ZUSAMMENFASSUNG 25

F) LITERATURVERZEICHNIS 26



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41545802_0034

A) EINLEITUNG

Vor etwa zwei Jahrzehnten wurden in den USA bei Rindern zwei bis dahin unbekannte Krankheitsbilder beobachtet und ihren Hauptsymptomen entsprechend als "Mucosal Disease" (Schleimhautkrankheit) bzw. "Virusdiarrhoe" beschrieben.

Nachfolgende Untersuchungen bewiesen, daß beide Krankheitsbilder durch die gleiche Virusart, das Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-) -Virus verursacht wurden.
Nach den ersten Beschreibungen der Mucosal Disease (Virusdiarrhoe) sind auch in anderen Ländern Untersuchungen über diese Rinderkrankheit durchgeführt worden. Dabei stellte sich heraus, daß das Virus über die ganze Welt verbreitet ist.

Die weite Verbreitung des Mucosal Disease(Virusdiarrhoe-)-Virus und der durch die Krankheit verursachte wirtschaftliche Schaden machen eingehende Untersuchungen notwendig, die für die Diagnose einer Mucosal Disease (Virusdiarrhoe)-Virusinfektion und für die Bekämpfung der Krankheit mit Impfstoffen von besonderer Bedeutung sind. In diesem Zusammenhang interessiert hauptsächlich die Frage nach der Existenz verschiedener Serotypen oder Subtypen dieser Virusart. Außerdem ist bis heute die Ursache für die Verschiedenartigkeit des Krankheitsverlaufes nach einer Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusinfektion unbekannt.

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, durch den serologischen Vergleich verschiedener Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämme im Kreuzneutralisationstest zur Klärung dieser Probleme beizutragen.

B) SCHRIFTTUM

1. Einführung

Die Mucosal Disease (MD) oder Virusdiarrhoe (VD) ist eine virusbedingte Infektionskrankheit des Rindes.
Sie wurde 1946 erstmals in den USA beobachtet und von O l a f s o n, M a c C a l l u m und F o x (29) auf Grund des vorherrschenden Symptoms als Virusdiarrhoe bezeichnet. Bei der von R a m s e y und C h i v e r s (30) im Jahr 1953 diagnostizierten Mucosal Disease standen dagegen Ulzerationen im gesamten Verdauungstrakt im Vordergrund.
Mucosal Disease und Virusdiarrhoe wurden als zwei verschiedene Krankheiten betrachtet, bis G i l l e s p i e und Mitarbeitern (14) 1961 der Nachweis gelang, daß es sich bei den Erregern der beiden Krankheiten um die gleiche Virusart handelt.
Das Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus ist über die ganze Welt verbreitet (28). In Deutschland wurde die Krankheit erstmals 1956 diagnostiziert (31,32,36,38).
Wie anfänglich in den USA, werden auch heute noch verschiedene Verlaufsformen der Virusinfektion beobachtet. Vielfach verläuft die Infektion klinisch inapparent, oder die Symptome sind so schwach ausgeprägt, daß sie unbemerkt bleiben. Daneben sind schwere, zum Teil tödliche Krankheitsformen bekannt, die sich in ihren Symptomen oft erheblich unterscheiden. Manchmal sind nur Schleimhautveränderungen im Maulbereich zu sehen, in anderen Fällen äußert sich die Krankheit klinisch nur in einer unstillbaren Diarrhoe. Oft sind beide Symptomenbilder vergesellschaftet.
Die Frage nach den Ursachen für die Verschiedenartigkeit des Verlaufs einer Mucosal Disease(Virusdiarrhoe-)-Virusinfektion ist bis heute nicht beantwortet worden.

Zwar wurden serologische Unterschiede zwischen einzelnen Virusstämmen festgestellt, Infektionsversuche mit verschiedenen Virusstämmen ließen jedoch hinsichtlich der Virulenz der Stämme keine exakten Unterschiede erkennen (8, 9, 28, 29, 3o, 31, 32, 33, 34, 36, 38).
Die Bezeichnung der Krankheit als "Mucosal Disease" bzw. "Virusdiarrhoe" ist bisheute uneinheitlich geblieben und richtet sich in der Regel nach den vorherrschenden Symptomen.

2. Biologische Eigenschaften des MucosalDisease(Virusdiarrhoe-)-Virus

Voraussetzung für alle gründlichen Studien über die Biologie, Morphologie, chemisch-physikalischen Eigenschaften und verwandtschaftlichen Beziehungen innerhalb einer Virusart stellt ein geeignetes Kultivierungsverfahren für das Virus dar.
So war eine Grundlagenforschung über das MD-VD - Virus anfänglich nur in geringem Umfang möglich, weil das Virus nur durch Übertragung von Organmaterial erkrankter Tiere auf empfängliche Rinder weitergezüchtet werden konnte.
Erst später erkannte man, daß sich das MD-VD - Virus in Zellkulturen gut vermehren läßt.
Zur Züchtung des MD-VD - Virus verwendet man mit Erfolg Kulturen aus Kälberhoden und Kälbernieren, Nieren und Hoden ausgewachsener Rinder und aus Nieren, Hoden und Hautmuskulatur vom Rinderfetus (1, 2, 5, 1o, 12, 15, 23, 25, 26, 35, 38). Nach Adaptierung ist auch eine Viruszüchtung in primären Schweinenierenkulturen und Kulturen des Schweinenierenzellstammes PK-15 möglich (27).
Man unterscheidet nicht zytopathogene und zytopathogene MD-VD - Virusstämme. Nicht zytopathogene Stämme lassen

sich in Gewebekulturen unter Verwendung zytopathogener Stämme nachweisen: G i l l e s p i e und Mitarbeiter (15) beobachteten, daß ein zytopathogener MD-VD - Virusstamm seine zellzerstörende Wirkung nicht mehr entfalten kann, wenn eine Zellkultur vorher mit einem nicht zytopathogenen Stamm infiziert wurde.
Bei zytopathogenen Virusstämmen sind Vakuolisierung des Zellplasmas, Zellschrumpfung und Kernpyknose in infizierten Zellkulturen charakteristisch (13,21,38).
In mit MD-VD - Virus infizierten Kulturen steigt der Gehalt an infektiösem Virus ab der 8. - 12. Stunde post infectionem (p.i.) an. Die höchsten Infektiositätstiter werden 72 - 96 Stunden p.i. erreicht, danach fällt der Titer relativ schnell wieder ab. Der Virusgehalt der Zellen infizierter Kulturen ist dabei immer geringer als der des Mediums (16).
Auf Grund der Ergebnisse fluoreszenzserologischer Untersuchungen nimmt man an, daß das Virus im Zellplasma synthetisiert wird (17).

3. Morphologische, chemisch-physikalische und antigene Eigenschaften des Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus

Das MD-VD - Virus enthält RNS und ist mit einer Hülle umgeben (6,7,1o,17). Sein Nukleokapsid weist Helixstruktur auf (11).
Elektronenoptischen Untersuchungen, bei denen sich ein Virusdurchmesser von 75 - 85 mμ ergab (11), stehen Ergebnisse von Filtrationsversuchen gegenüber, wobei sich eine Partikelgröße von ca 4o mμ nachweisen ließ (7,9,22).

Die Sedimentationskonstante des Virus beträgt 8o-9o S (22). Das MD-VD - Virus ist chloroform-, äther-, trypsin - und säurelabil (7,9,1o,16,17,22).
Bei 25°C bleibt das Virus über mindestens 24 Stunden stabil, bei 36°C wird innerhalb 48 Stunden 99 % seiner Infektiosität zerstört (2,17). Bei 50°C bewirkt eine Zugabe von $MgCl_2$ keine Stabilisierung.
Neben dem infektiösen und immunisierenden Prinzip verfügt das Virus über ein komplementbindendes S-Antigen, das vom Virus abtrennbar vorkommt. Es ist im Agargel-Diffusionstest und der Komplementbindungsreaktion nachweisbar (3,4,5,9,18, 19,2o,37). Das S-Antigen, in Organen und Schleimhäuten des Verdauungstraktes von an MD-VD erkrankten Rindern vorkommend, läßt sich von dem aus infizierten Gewebekulturen gewinnbaren löslichen Antigen nicht unterscheiden (4,5,18).

Das lösliche Antigen ist ein hitzelabiles Protein. Es wird bei 56°C innerhalb 3o Minuten zerstört, ist jedoch bei -20°C stabil. Weitere Eigenschaften sind Chloroform- und Ätherstabilität, Beständigkeit bei pH-Werten zwischen 5 und 8, Unempfindlichkeit gegenüber ultravioletten Strahlen sowie Labilität bei Behandlung mit Trypsin und α-Chymotrypsin (4,5,19).
In infizierten Zellkulturen ist das S-Antigen schon früher nachweisbar als das infektiöse Virus. Bei der Gradientenzentrifugation wies das lösliche Antigen eine geringere Dichte auf als das infektiöse Virus (19).

4. Serologische Beziehungen zwischen verschiedenen Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämmen

Nach einer Infektion mit MD-VD - Virus kommt es im Tierkörper zur Bildung virusneutralisierender, präzipitierender und komplementbindender Antikörper, die im Blutserum nachweisbar sind (1,2,8,12,13,14,2o,24,25,34,38).

G i l l e s p i e und Mitarbeiter (14) wiesen als erste nach, daß das Mucosal Disease - Virus mit dem Erreger der Virusdiarrhoe identisch ist: das Serum eines mit dem nicht zytopathogenen VD-Virusstamm New York - 1 infizierten Kalbes neutralisierte einen Stamm von MD-Virus und 5 Virusstämme, die von Rindern mit Symptomen der Virusdiarrhoe isoliert worden waren. Die Versuchsergebnisse zeigten eine enge serologische Verwandtschaft der einzelnen Virusstämme auf, Unterschiede waren jedoch erkennbar.
Alle bislang mit dem Neutralisationstest durchgeführten Untersuchungen brachten ähnliche Ergebnisse, wobei allerdings auf Grund der jeweiligen Versuchsanordnung Schlüsse bezüglich serologischer Unterschiede zwischen verschiedenen Virusstämmen nicht immer möglich waren. So wurde z.B. der VD-Virusstamm Oregon C24V, von G i l l e s p i e und Mitarbeitern (13) in den USA isoliert und heute allgemein als Referenzstamm gebräuchlich, durch Seren von Kälbern neutralisiert, welche mit verschiedenen MD-VD - Virusstämmen aus den USA und Europa immunisiert worden, bzw. natürlich infiziert waren (13,25,33).
In Neutralisationstesten, durchgeführt nach der Serumverdünnungsmethode, waren die Serumantikörpertiter jeweils dann am höchsten, wenn die Seren mit dem homologen Virus als Testantigen gekoppelt wurden. Zu solchen Ergebnissen kamen D i n t e r und Mitarbeiter (8) beim Vergleich von schwedischen und dänischen VD-Virusstämmen mit dem Virusstamm Oregon C24V unter Verwendung von Kaninchenimmunseren.
Gleichsinnig verliefen die Untersuchungen, in denen Kälberimmunseren gegen MD-VD - Virusstämme aus den USA getestet wurden (2o,24).
Kreuzneutralisationsteste nach der Virusverdünnungsmethode mit verschiedenen MD-VD - Virusstämmen führten B ö g e l (1) sowie W i z i g m a n n und W e i ß (38) durch.

So wurde im Neutralisationstest zwischen dem nordamerikanischen Stamm Oregon C24V und dem in Norddeutschland isolierten Stamm MD-1 zwar eine Kreuzreaktion festgestellt, jedoch waren die aus den homologen Reaktionsgemischen resultierenden Neutralisationsindizes signifikant höher als die bei heterologen Reaktionspartnern (1).

Beim Vergleich von 4 in Süddeutschland isolierten MD-VD-Virusstämmen mit dem Stamm Oregon C24V im Neutralisationstest wiesen alle Stämme serologische Beziehungen zueinander auf, jedoch unterschieden sich die 4 deutschen Stämme signifikant von dem amerikanischen Virusstamm. Gleichzeitig waren bei den 4 deutschen Stämmen Unterschiede erkennbar (38).

G u t e k u n s t und Mitarbeiter (2o) stellten beim serolgischen Vergleich von zwei MD-VD - Virusstämmen fest, daß die Reaktionen im Neutralisationstest stammspezifisch waren, während sich in der Komplementbindungsreaktion keine Unterschiede zwischen den Stämmen zeigten.
Bei einer zusammenfassenden Betrachtung der in der Literatur beschriebenen Ergebnisse kann man feststellen, daß serologische Unterschiede zwischen den verschiedenen MD-VD-Virusstämmen nur im Neutralisationstest nachweisbar waren. Im Agargel-Präzipitationstest bzw der KBR reagierten dagegen alle untersuchten Stämme gleichartig.

5. Immunisierende Eigenschaften des Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus

Nach einer Infektion mit MD-VD-Virus entwickeln Rinder eine belastbare Immunität.
Die humorale Immunität ist durch das Auftreten virusneutralisierender Serumantikörper nachweisbar.
Über eine eventuell bestehende Gewebsimmunität konnten in der zugänglichen Literatur keine Angaben gefunden werden.

Erfolgreiche Kreuzimmunisierungsversuche an Rindern machten G i l l e s p i e und Mitarbeiter (12,13) mit zwei nicht zytopathogenen MD-VD - Virusstämmen bzw. einem nicht zytopathogenen Virusstamm und dem Oregon C24V - Virus.

Zu gleichsinnigen Resultaten kamen G i l e t t e (17), T a y l o r und Mitarbeiter (33) sowie T y l o r und Mitarbeiter (34) unter Verwendung verschiedener MD-VD-Virusstämme. W i z i g m a n n und W e i ß (38) konnten Kälber mit dem Virusstamm Oregon C24V gegen ein zwar verwandtes, aber nicht serologisch identisches MD-Virus immunisieren.

6. Beziehungen des Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virus zum Virus der klassischen Schweinepest

Auf Grund der Ergebnisse bisheriger Untersuchungen über seine biologischen, chemisch-physikalischen und morphologischen Eigenschaften konnte das MD-VD-Virus noch nicht in eine der bekannten Virusgruppen eingeordnet werden.

Echte Beziehungen scheint das MD-VD-Virus lediglich zum Virus der klassischen Schweinepest zu haben, welches gleichfalls noch nicht in eine Virussystematik eingruppiert werden konnte.

D a r b y s h i r e (3) wies 1960 als erster verwandtschaftliche Beziehungen zwischen MD-VD-Virus und Schweinepestvirus nach. In Schweinepest-Antiseren fand er präzipitierende Antikörper gegen MD-VD-Virus und in MD-Antiserum solche gegen Schweinepest-Antigen. Diese Ergebnisse wurden im Agargel-Diffusionstest von anderen Autoren bestätigt (18,37).

D i n t e r (7) gelang es, mit Schweinepest-Hyperimmunserum MD-Virus und mit Seren von Rindern, welche an Virusdiarrhoe erkrankt waren, Schweinepestvirus zu neutralisieren. Die Serumantikörpertiter waren jedoch bei homologen Reaktions-

partnern immmer höher als bei heterologen. Zu ähnlichen Ergebnissen kam der Autor bei Verwendung von Kaninchen-Hyperimmunseren. G u t e k u n s t und Mitarbeitern (18) gelang dagegen keine Kreuzneutralisation zwischen MD-VD- und Schweinepestvirus. Sie erzielten nur im Präzipitationstest eine Kreuzreaktion und nehmen deshalb an, daß die Verwandtschaft zwischen MD-VD-Virus und Schweinepestvirus lediglich auf einem gemeinsamen löslichen Antigen beruht.

C) EIGENE UNTERSUCHUNGEN

I. M a t e r i a l und M e t h o d e n

1. Virusstämme

In die Versuche wurden 1o MD-VD-Virusstämme einbezogen, die in den USA, in der Bundesrepublik, Dänemark, Frankreich, der Schweiz und Ungarn aus Rindern isoliert worden waren.
Eine Aufstellung über die Herkunft und Bezeichnung der Virusstämme bringt die Tabelle 1.
Alle Virusstämme hatten vor Versuchsbeginn im Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München je 3 Plaquepassagen in Kälberhodenkulturen durchlaufen.

Tabelle 1: Übersicht über die in die Untersuchungen einbezogenen MD-VD-Virusstämme

Virusstamm			Art und Zahl der Viruspassagen vor Versuchsbeginn
Nr.	Herkunft	Bezeichnung	
1	USA	VD, Oregon C24V	43 ENK-K.P. + 9 KH-K.P.
2	USA	MD, NADL	13 ENK-K.P. + 8 KH-K.P.
3	BRD	MD, MD - 1	22 ENK-K.P. +13 KH-K.P.
4	BRD	MD, Lamspringe 735	3 ENK-K.P. +47 KH-K.P.
5	BRD	MD, München 745/65	15 KH-K.P.
6	BRD	MD, München 1621/65	17 KH-K.P.
7	Dänemark	VD, Ug-59	6 ENK-K.P. +11 KH-K.P.
8	Frankreich	VD, AR	9 KH-K.P.✗
9	Schweiz	VD, V 151/64	1 ENK-K.P. +1o KH-K.P.
1o	Ungarn	VD, 86-IV/65	17 KH-K.P.

Anmerkungen: ENK-K.P. = Passage in Kälbernierenkultur
KH -K.P. = Passage in Kälberhodenkultur
✗ Art und Zahl der Passagen vor Erhalt des Virusstammes unbekannt

2. Gewebezüchtung

Zur Antigenherstellung, für Titrationen und Neutralisationsteste kamen primäre Kälberhodenkulturen zur Verwendung. Aus Hoden gesunder Schlachtkälber wurde das Parenchym unter sterilen Bedingungen aus der Tunica albuginea herausgeschält, in erbsengroße Stückchen geschnitten und zweimal mit Phosphatpufferlösung (pH = 7,4) gewaschen. Zur Isolierung von Einzelzellen aus dem Parenchym fand die bekannte Andauungsmethode mit 0,125%iger Trypsinlösung Anwendung. Trypsiniert wurde nach Vortrypsinieren (10 Minuten) bei Zimmertemperatur während einer Stunde.
Die Aufschwemmung der Zellen für die Anzüchtung erfolgte in einem Medium, welches aus 78% Earle'scher Lösung, 10% Kälberserum, 10% Laktalbumin einer 5%igen Lösung, 2% Phenolrot einer 0,1%igen Lösung und Antibiotika (100 I.E. Penicillin/ml und 100 γ Dihydrostreptomycin/ml) bestand. Je nachdem, ob 25o ooo oder 8oo ooo Zellen pro ml Medium angezüchtet worden waren, wuchsen diese innerhalb 6 bzw. 3 Tagen zu einem dichten Zellrasen aus.
Für Titrationen und Neutralisationsteste wurden die Zellen in Reagenzröhrchen (1,5 ml Medium), für die Antigenherstellung in Vierkantflaschen (2o ml Medium) angezüchtet.

Das Erhaltungsmedium für die Zellkulturen bestand aus 88% Earle'scher Lösung, 10% Laktalbumin einer 5%igen Lösung, 2% Phenolrot einer 0,1%igen Lösung und Antibiotika (Röhrchen 2 ml, Vierkantflaschen 15 ml).

3. Antigenherstellung

Zur Gewinnung von Antigenen für die Immunisierung von Kaninchen und für die Neutralisationsteste wurde von dichten Kälberhodenkulturen in Vierkantflaschen das Medium abgesaugt und der Zellrasen jeder Flasche mit 2 ml unverdünnter infektiöser Gewebekulturflüssigkeit beimpft.

Nach einer Adsorption bei Zimmertemperatur während 4 Stunden wurde das Inokulum abgesaugt und in jede Vierkantflasche 15 ml Erhaltungsmedium eingefüllt. Die anschließende Bebrütung der Kulturen bei 37°C dauerte 68-72 Stunden. Danach erfolgte die Antigengewinnung durch Zentrifugieren des infektiösen Gewebekulturmediums bei ca 1500 g auf die Dauer von 15 Minuten.
Bis zur Verwendung lagerten die Antigene bei -65°C.
Die so gewonnenen Antigene hatten einen Infektiositätstiter von $10^{4,5}$ bis $10^{6,75}$ mittleren kulturinfektiösen Dosen (KID_{50}) pro ml.

4. Herstellung von Kaninchen-Immunseren

Zur Herstellung von Immunseren gegen die 10 MD-VD-Virusstämme dienten Kaninchen mit einem Gewicht von 2,5-3,5 kg. Den Kaninchen wurden 8ml unverdünnte infektiöse Gewebekulturflüssigkeit injiziert (je 2 ml intravenös, intraperitoneal, intramuskulär und subkutan). In Abständen von jeweils 7 Tagen folgten 5 weitere intravenöse Injektionen von je 2 ml.
Zwei Kaninchen wurden mit Gewebekultur-Normalantigen immunisiert. Dazu waren unbeimpfte Kälberhodenkulturen mit Erhaltungsmedium eingefroren, wieder aufgetaut, und der Zelldetritus abzentrifugiert worden. Der Überstand diente als Impfmaterial.
10-14 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen unter Narkose durch Herzpunktion entblutet und das Serum gewonnen. Seine Aufbewahrung erfolgte bei -20° C.

5. Virustitrationen

Infektiöse Gewebekulturflüssigkeit wurde in Potenzen von 10 mit einer Mischung aus 90% Earle'scher Lösung und 10% Laktalbumin verdünnt und von jeder Verdünnung 4 Kulturröhrchen

mit je 0,1 ml beimpft.
Als Positiv galten alle Kulturen, die bei einer Inkubation von 37°C innerhalb 7 Tagen virusspezifisch degenerierten. Zur Berechnung der Infektiositätstiter von Virussuspensionen fand die Methode von B e h r e n s und K ä r b e r Anwendung.

6. Technik der Neutralisationsteste

Die Bestimmung des Antikörpergehaltes von Kaninchen-Immunseren und Normalseren, sowie der serologische Vergleich der MD-VD - Virusstämme erfolgte im Neutralisationstest.
Die S e r u m v e r d ü n n u n g s m e t h o d e wurde zur Titration virusneutralisierender Antikörper in Kaninchenseren angewandt. Dazu mischte man in Potenzen von 2 fallende Serumverdünnungen mit konstanter Virusverdünnung (ca 100 KID_{50}) in Mengen von je 1 ml.
Zum serologischen Vergleich von MD-VD - Virusstämmen diente die V i r u s v e r d ü n n u n g s m e t h o d e des Neutralisationstestes. Dabei bestanden die Reaktionsgemische aus je 1ml konstanter Serumverdünnung und in Potenzen von 10 fallenden Virusverdünnungen.
Die Immunserumgebrauchsverdünnung war jeweils so eingestellt, daß sie rechnerisch etwa die 8-fache Menge der Antikörper enthielt, welche ca 100 KID_{50} des homologen Virus neutralisierten. Die parallel laufenden Normalserumkontrollen lagen immer in der gleichen Verdünnung vor wie das Immunserum.
In einem Versuchsansatz wurden immer alle 10 MD-VD- Virusstämme gegen ein Immunserum und Normalserum getestet.

Unmittelbar vor Versuchsbeginn erfolgte die Inaktivierung der Seren (30 Minuten bei 56°C im Wasserbad).
Als Verdünnungsmittel für Virus- und Serumverdünnungen

diente eine Mischung von 90% Earle'scher Lösung und 10% Laktalbumin einer 5% igen Lösung.
Nach der "in-vitro" - Bindung während 60 Minuten bei 37°C im Wasserbad beimpfte man mit jedem Reaktionsgemisch 4 Röhrchenkulturen. Pro Reagent betrug die Impfdosis o,2 ml. Anschließend wurden die Kulturen 7 Tage lang beobachtet. Alle Kulturen, welche in diesem Zeitraum virusspezifisch degenerierten, sind als positiv bewertet worden.
Die Berechnung der Serumantikörpertiter und Infektiositätstiter von Serum/Virus-Gemischen erfolgte nach der Methode von B e h r e n s und K ä r b e r.

7. Bakteriologische Prüfung

Alle verwendeten Materialien unterlagen vor ihrer Verwendung einer Prüfung auf bakterielle Verunreinigungen nach den bekannten Methoden. Unsteriles Material wurde verworfen.

II. Versuche und Ergebnisse

1. Untersuchungen zur Spezifität des Neutralisationstestes in Kälberhodenkulturen

Zehn Kaninchen wurden mit den einzelnen MD-VD-Virusstämmen geimpft und auf die Bildung virusneutralisierender Antikörper untersucht. In den Kaninchen-Immunseren ließen sich Antikörpertiter zwischen 1 : 64 und 1 : 256 nachweisen. Dagegen zeigten Kaninchen-Normalseren, die unter Verwendung von Normalkulturantigen hergestellt wurden, in einer Verdünnung von 1 : 2 keine virusneutralisierende Wirkung.
Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, daß es möglich ist, Kaninchen gegen MD-VD-Virus zu immunisieren und die gebildeten virusneutralisierenden Antikörper im Neutralisationstest nachzuweisen.

2. Untersuchungen zur Feststellung verwandtschaftlicher Beziehungen zwischen 1o Mucosal Disease(Virusdiarrhoe-)-Virusstämmen im Kreuzneutralisationstest

In die Untersuchungen wurden 1o MD-VD-Virusstämme einbezogen, welche in den USA, in der Bundesrepublik, Dänemark, Frankreich, der Schweiz und in Ungarn aus Rindern isoliert worden waren. Alle Stämme hatten vor Versuchsbeginn je 3 Plaquepassagen in Kälberhodenkulturen durchlaufen.

Die Prüfung der serologischen Beziehungen der Stämme untereinander erfolgte im Kreuzneutralisationstest nach der Virusverdünnungsmethode. Dabei wurden in jeweils einem Versuchsansatz alle 1o Virusstämme gegen ein Immunserum und Normalserum getestet.
Zur Beurteilung der Ergebnisse diente der Neutralisationsindex, welcher sich als Differenz des log der Infektiositätstiter von Virus/Normalserum- und Virus/Immunserum-

Gemischen ergab. Die Signifikanzschwelle betrug im angewandten System 0,91 (bei 1% Irrtumswahrscheinlichkeit).

Die Ergebnisse der Kreuzneutralisationsteste sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt.

Die neutralisierende Wirkung der konstant verdünnten Kaninchenimmunseren erstreckte sich auf $10^{3,5}$ bis $10^{4,5}$ KID_{50} des homologen Virus. Damit wurde in den meisten Fällen nicht mehr Virus neutralisiert, als überhaupt vorgelegt wurde, was für die Berechnung des Neutralisationsindex von Bedeutung war. Andererseits erreichte man mit der gewählten Serumverdünnung auch meistens noch eine signifikante Neutralisationswirkung gegenüber heterologen MD-VD-Virusstämmen.

Beim Vergleich der Virusstämme im Kreuzneutralisationstest war zwischen allen 10 Testvirusstämmen eine serologische antigene Verwandtschaft nachweisbar. Keiner der geprüften Stämme erwies sich jedoch als serologisch identisch mit einem anderen Teststamm.

6 der 10 Immunseren zeigten gegenüber dem homologen Virus eine signifikant stärker neutralisierende Wirkung als gegenüber heterologen Antigenen (Immunseren gegen die Virusstämme 1,2,3,4,5,7). Mit dem Immunserum gegen den Virusstamm Oregon C24V (Nr. 1 bzw. 1 a) gelang dieser Nachweis erst in einem zweiten Versuch unter Verwendung einer höheren Gebrauchsverdünnung des Serums.
Bei 4 Immunseren war der Neutralisationsindex des homologen Antigens nicht signifikant höher als der von verschiedenen heterologen Virusstämmen (Immunseren gegen die Virusstämme Nr. 6,8,9,1o). Unter Beachtung einer Signifikanzschwelle von 0,91 verhielten sich gegenüber dem Immunserum gegen Stamm Nr. 6 die Virusstämme Nr. 6 und 3, und gegenüber dem Antiserum Nr. 8 die Stämme Nr. 8 und 9 gleich .

Tabelle 2: Überblick über die Beziehungen zwischen 10 Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämmen im Kreuzneutralisationstest

Kaninchen-Immunserum gegen Virusstamm	Immunserum-Gebrauchs-verdünnung		Virusstämme									
			Oregon C24V	NADL	MD-1	Lamspringe 735	München 745/65	München 1621/65	Ug-59	AR	V151/64	86-IV/65
		Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
USA VD, Oregon C24V	1 : 10	1	4,5	1,5	0,75	≦ 1,25	1,5	1,0	0,5	0,25	0,75	≧ 3,0
USA MD, NADL	1 : 10	2	1,75	3,75	0,5	≦ 1,0	1,25	2,0	0,75	0	2,25	1,0
BRD MD, MD-1	1 : 16	3	1,5	1,25	≧ 4,0	0,75	0	3,0	0,5	≦ 0,5	2,0	1,5
BRD MD, Lamspringe 735	1 : 16	4	1,0	2,25	1,0	4,5	0,75	0,75	3,0	1,75	1,0	0,25
BRD MD, München 745/65	1 : 32	5	1,5	2,75	2,75	≦ 1,75	3,75	2,25	1,5	1,25	2,25	2,25
BRD MD, München 1621/65	1 : 32	6	0,5	2,25	4,25	2,25	0,75	3,5	1,25	1,75	1,75	0,5
Dänemark VD, Ug-59	1 : 32	7	3,0	2,5	2,5	3,25	2,75	2,5	4,25	1,75	2,25	2,25
Frankreich VD, AR	1 : 16	8	1,75	1,75	2,0	2,75	2,25	1,75	1,5	3,75	3,5	1,5
Schweiz VD, V151/64	1 : 16	9	3,0	3,0	3,5	≦ 1,5	2,0	3,75	2,0	2,75	≧ 4,0	2,25
Ungarn VD, 86-IV/65	1 : 16	10	≧ 4,25	≧ 2,5	2,25	1,75	0,5	3,75	2,25	3,0	3,5	≧ 3,75
USA VD, Oregon C24V	1 : 32	1a	4,0	-	-	-	-	-	-	-	-	2,75

Anmerkungen: Die angegebenen Werte sind Neutralisationsindizes

Signifikanzschwelle D = 0,91

Ebenso war bei Verwendung des Serums gegen Stamm 9 nicht zu unterscheiden zwischen den Stämmen Nr. 9, 3 und 6 und beim Antiserum Nr. 10 zwischen den Virusstämmen Nr. 10, 1,6,8,9. Hier ist jedoch einschränkend zu sagen, daß die Immunseren gegen die Virusstämme Nr. 9 und 10 soviel des homologen Virus neutralisierten, daß der Neutralisationsendpunkt nicht genau festgelegt werden konnte. Bei einer stärkeren Verdünnung dieser Antiseren hätten sich vielleicht signifikante Unterschiede zwischen den betreffenden Stämmen ergeben.
In den umgekehrten, d.h. gekreuzten Neutralisationstesten stellte sich jedoch heraus, daß au ch die Virusstämme, zwischen denen zunächst keine Antigenunterschiede deutlich geworden waren, signifikante Unterschiede bestanden. So wurde bei Verwendung des Serums gegen Stamm 3 ein deutlicher Unterschied zwischen Stamm 3 und 6, bzw. beim Antiserum Nr. 9 ein solcher zwischen den Stämmen Nr. 8 und 9 erkennbar. In gleicher Weise konnten die serologischen Unterschiede zwischen den Stämmen 9,3,6, bzw. 10,1,6,8 und 9 abgeklärt werden.

Die Unterschiede zwischen den einzelnen Virusstämmen waren verschieden stark ausgeprägt. Manche Stämme unterschieden sich serologisch nur geringgradig, andere wiederum mehr bzw. sehr stark.
Unter den geprüften MD-VD-Virusstämmen wiesen der Stamm 1 (USA, Oregon C24V) und der Stamm 10 (Ungarn, 86-IV/65) die geringsten Unterschiede auf. Eine Differenz wurde erst bei höherer Verdünnung des Oregon-Antiserums sichtbar, und auch hier lag sie mit 1,25 nur wenig über der Signifikanzschwelle. Ebenfalls sehr eng verwandt sind die Stämme 3 (MD-1) und 6 (München 1621/65). Zwar geringere, aber trotzdem relativ enge serologische Beziehungen bestehen zwischen den Virusstämmen 2 (USA,NADL) und 9 (Schweiz V151/64), den Stämmen Nr. 2 und Nr. 6 (München 1621/65)

und zwischen dem Stamm Nr. 7 und Stamm Nr. 4 (Lamspringe 735).
Besonders stark unterschied sich der Stamm Nr. 4 (Lamspringe 735) von den Stämmen Nr. 1 (Oregon C24V), Nr.3 (MD_1), Nr. 5 (München 745/65), Nr. 9 (Schweiz V151/64) und Nr. 1o (Ungarn 86-IV/65).
Geringe serologische Beziehungen zeigten auch die Stämme Nr. 3 (MD-1) und Nr. 6 (München 1621/65) zum Stamm Nr. 1 (Oregon C24V).

Die Ergebnisse der Kreuzneutralisationsteste deuten darauf hin, daß das im Neutralisationstest erfaßbare Antigenspektrum der getesteten MD-VD-Virusstämme verschieden groß ist.
Errechnet man die Differenzen zwischen den Neutralisationsindizes von jeweils homologem Serum/Virus-Gemisch und den heterologen Gemischen für die einzelnen Versuchsreihen, und bildet aus diesen Werten für jedes Immunserum einen Mittelwert, so geben diese Mittelwerte einen gewissen Anhaltspunkt für das Antigenspektrum der einzelnen Virusstämme.
Klammert man die Testreihen mit den Immunseren gegen die Stämme Nr. 3,9 und 1o aus, weil in diesen Fällen der Neutralisationsendpunkt von den homologen Serum/Virus-Gemischen nicht genau festgelegt werden konnte, schwanken die Differenz-Mittelwerte zwischen 1,7 und 3,3. So gesehen hat unter den geprüften Stämmen der Stamm Oregon C24V das kleinste, der Stamm Dänemark, Ug-59 das größte Antigenspektrum.
In der Tabelle 3 sind Passagenzahl und die "Antigenspektrum-Werte" der untersuchten Virusstämme einander gegenübergestellt. Dabei fällt auf, daß die Virusstämme, welche vor Versuchsbeginn viele Passagen durchlaufen haben, höhere Werte,d.h. ein kleineres (serologisch nachweisbares) Antigenspektrum besitzen als andere Stämme, deren Passagenzahl geringer war.

Tabelle 3: Gegenüberstellung von Passagenzahl und Antigenspektrum-Werten der untersuchten MD-VD - Virusstämme

Virusstamm	Zahl der Kultur-passagen vor Versuchsbeginn	Errechneter Wert für das serologisch nachweisbare Antigenspektrum
VD, Oregon C24V	52	3,3
MD, NADL	21	2,6
MD, MD-1	35	≧ 2,8
MD, Lamspringe 735	50	3,2
MD, München 745/65	15	1,7
MD, München 1621/65	17	1,8
VD, Ug-59	17	1,7
VD, AR	≦ 9	2,1
VD, V 151/64	11	≧ 1,3
VD, 86-IV/65	17	≧ 1,2

D) BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

10 Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämme aus den USA und aus Europa zeigten bei vergleichenden serologischen Untersuchungen im Kreuzneutralisationstest mehr oder weniger stark ausgeprägte verwandtschaftliche Beziehungen. Diese Ergebnisse stimmen mit den Befunden anderer Autoren überein (1,13,14,2o,25,33,38). Demnach sind beim MD-VD-Virus keine selbständigen Serotypen, sondern nur Subtypen oder allenfalls Varianten zu unterscheiden. Auffallend waren die Ergebnisse der Untersuchungen jedoch insofern, als sich keiner der 10 Virusstämme als serologisch identisch mit einem anderen Stamm erwies.

Die zehn MD-VD-Virusstämme hatten vor Versuchsbeginn eine unterschiedlich große Zahl von Gewebekulturpassagen durchlaufen. Vergleicht man Passagenzahl und die errechneten Werte des serologisch erfaßbaren Antigenspektrums der einzelnen Stämme, so scheint zwischen diesen beiden Größen ein direkter Zusammenhang zu bestehen. Die Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Antigenspektrum eines MD-VD-Virusstammes im Neutralisationstest mit zunehmender Passagenzahl kleiner wird.
Es ist deshalb bei den untersuchten Virusstämmen nicht exakt zu unterscheiden zwischen wirklichen Subtypen und Stämmen, die nur durch Gewebekulturpassagen in ihren serologischen Eigenschaften verändert worden sind.
Die serologischen Unterschiede zwischen den Virusstämmen waren allerdings teilweise so stark ausgeprägt, daß manche Stämme als wirkliche Subtypen angesprochen werden müssen.

Das Vorkommen von Subtypen innerhalb einer Virusart ist für die praktische Virusdiagnostik von besonderer Bedeutung. So ist z.B. immer mit der Möglichkeit zu rechnen, daß ein

zu identifizierendes MD-VD-Virus bei entsprechend hoher Verdünnung des Referenz-Immunserums nicht neutralisiert und infolgedessen nicht als MD-VD-Virus erkannt wird.

Andererseits ist es möglich, daß niedere Antikörpertiter bei Verwendung eines Teststammes, welcher einem anderen Subtyp angehört als der, welcher die Antikörperproduktion stimulierte, nicht erfaßt werden.
In der Regel wird heute in jedem Laboratorium der Virusstamm Oregon C24V als Referenzstamm herangezogen. Eben dieser MD-VD-Stamm erscheint jedoch auf Grund der beschriebenen Untersuchungsergebnisse als Referenzstamm wenig geeignet, da er unter 1o MD-VD-Virusstämmen das geringste Antigenspektrum aufwies. Der dänische Stamm Ug-59 z.B. dürfte sich, da sein Antigenspektrum wesentlich größer ist, für Routineuntersuchungen besser eignen. In jedem Falle ist es aber ratsam, bei Neutralisationstesten nach der Serumverdünnungsmethode mit möglichst geringer Virusgebrauchsdosis, bzw. bei Testen zur Identifizierung eines fraglichen MD-VD-Virusstammes mit Immunseren von 2 oder mehr bekannten MD-VD-Stämmen zu arbeiten.
Bei der Virusverdünnungsmethode sollte die Immunserum-Gebrauchsverdünnung so eingestellt werden, daß mindestens 1oo ooo KID_{50} des homologen Virus neutralisiert werden. Nach C o g g i n s (2) besteht zwischen Serumantikörpertiter und Virusgebrauchsdosis ein direkter linearer Zusammenhang, und zwar ändert sich im Neutralisationstest mit MD-VD-Virus bei homologen Reaktionspartnern der Serumantikörpertiter bei Erhöhung oder Erniedrigung der Testantigen-Menge um 1 Zehnerpotenz um 1,46 $\log_2$. Sollen also 1oo ooo KID_{50} des homologen Virus neutralisiert werden, so ist die Immunserum-Gebrauchsverdünnung um ca 4,5 $\log_2$ geringer verdünnt anzusetzen als sein Antikörpertiter ist (gemessen gegen 1oo KID_{50} des homologen Virus).

G u t e k u n s t und Mitarbeiter (2o) fanden beim Vergleich von 2 MD-VD-Virusstämmen in der Komplementbindungsreaktion im Gegensatz zum Neutralisationstest keine Antigenunterschiede. Es wäre nachzuprüfen, ob tatsächlich alle bekannten MD-VD-Virusstämme in der KBR gleich reagieren. Im positiven Falle wäre es dann besser, für Routineuntersuchungen die KBR an Stelle des Neutralisationstestes heranzuziehen.

Das in Quantität und Qualität unterschiedliche Antigenspektrum einzelner MD-VD-Virusstämme muß auch bei der Bestimmung neuer Subtypen beachtet werden. Es kann vorkommen, daß 2 Stämme von einem Immunserum gleichermaßen neutralisiert werden, so daß zunächst zwischen den beiden Virusstämmen kein antigener Unterschied sichtbar wird, während sich die Stämme im gekreuzten Neutralisationstest möglicherweise unterschiedlich verhalten.
Ebenso sollte das unterschiedlicge Antigenspektrum auch bei Kreuzneutralisationsversuchen berücksichtigt werden, mit denen die Beziehungen des MD-VD-Virus zum Schweinepestvirus geprüft werden. Es ist denkbar, daß hierbei mit verschiedenen MD-VD-Virusstämmen auch verschiedene Ergebnisse erzielt werden. Vielleicht lassen sich so auch die in der Literatur uneinheitlichen Ergebnisse erklären, welche bei serologischen Vergleichen der beiden Virusarten im Neutralisationstest erhalten wurden.

In Bezug auf die Brauchbarkeit der verschiedenen MD-VD-Virusstämme als Ausgangsmaterial für Impfstoffe gegen die MD-VD lassen sich aus den Versuchsergebnissen keine exakten Schlüsse ziehen. Das antigene Verhalten der Virusstämme im Kreuzneutralisationstest sagt noch nichts aus über ihre immunisierende Wirkung. Wichtig erscheint in diesem Zusammenhang jedoch, daß im Neutralisationstest keine selbständigen Serotypen gefunden wurden. Somit ist

anzunehmen, daß sich die MD-VD-Virusstämme auch in immunisierenden Eigenschaften nur in begrenztem Umfang unterscheiden. Diese Annahme wird durch Befunde anderer Autoren insofern bestätigt, als Kreuzimmunisierungsversuche mit verschiedenen, auch serologisch nicht identischen MD-VD-Virusstämmen in jedem Fall positiv verliefen (12,13, 17,33,34,38).

Für die Brauchbarkeit eines Virusstammes als Impfstoffantigen ist außerdem seine gute immunisierende Wirkung von Bedeutung. Die Frage, ob sich die einzelnen MD-VD-Virusstämme auch in dieser Beziehung unterscheiden, muß noch in eingehenden Untersuchungen geklärt werden.

E) ZUSAMMENFASSUNG

1o Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämme aus den USA, der Bundesrepublik, Dänemark, Frankreich, der Schweiz und aus Ungarn wurden im Kreuzneutralisationstest auf ihre serologische Verwandtschaft geprüft.
Die Untersuchungen erfolgten nach der Virusverdünnungsmethode, wobei in jeweils einem Versuchsansatz die Virusstämme mit konstant verdünntem Kaninchen-Immunserum und Normalserum gekoppelt wurden.

Alle 1o untersuchten Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstämme erwiesen sich zwar als serologisch verwandt, jedoch war keiner der Stämme identisch mit einem anderen Stamm.

Die serologischen Unterschiede zwischen den einzelnen Virusstämmen waren unterschiedlich stark ausgeprägt. Manche Stämme zeigten nur geringe, andere dagegen große Unterschiede.

Das Antigenspektrum der geprüften Virusstämme ist unterschiedlich. Ein besonders geringes Antigenspektrum besitzt der allgemein als Referenzstamm gebräuchliche Mucosal Disease (Virusdiarrhoe-)-Virusstamm Oregon C24V. Dieser Virusstamm erscheint deshalb als Referenzstamm wenig geeignet.

SUMMARY

10 mucosal disease (virus diarrhea) virus strains from the USA, Germany, Danmark, France, Switzerland and Hungary were examined for serological relationship in cross neutralization tests.
Virus dilution method was used. In each experiment virus strains were diluted and given to a constant dilution of rabbit hyperimmune and normal serum.

All 10 virus strains were antigenically related, but none of the strains were identical.

Serological differences between the various virus strains were more or less distinct; some strains only showed little, others marked differences.

Antigenic spectrum of all investigated strains is different. The commonly used reference mucosal disease (virus diarrhea) virus strain Oregon C24V has an especially small antigenic spectrum. It is concluded that this virus strain is not suitable as reference strain.

F) LITERATURVERZEICHNIS

1. Bögel,K. — Über die Eignung des Plättchentestes für die Diagnostik bei der Mucosal Disease. Zbl.Bakt.I.Orig. 193, 34 (1964)

2. Coggins,L. — Standardization of virus-neutralization test for bovine virusdiarrhea. Amer.J.vet.Res. 25, 1o3 (1964)

3. Darbyshire,J.H. — A serological relationship between swine fever and mucosal disease of cattle. Vet.Record 72, 331 (196o)

4. Darbyshire,J.H. — The gel diffusion technique in studies of viruses of veterinary importance; II. Applications to swine fever and mucosal disease. Vet.Bull. 35, 71 (1965)

5. Darbyshire,J.H. — Immunodiffusion studies with bovine mucosal disease. J.comp.Path. 77, 1o7 (1967)

6. Diderholm,H. und Z. Dinter — Infectious RNA derived from bovine virus diarrhoea virus. Zbl.Bakt.I.Orig. 2o1, 27o (1966)

7. Dinter,Z. — Relationship between bovine virus diarrhoea virus and hog cholera virus. Zbl.Bakt.I.Orig. 188, 475 (1963)

8. Dinter,Z. und H.C. Borgen — Bovine virus diarrhoea (mucosal disease) in shwedish and danish cattle Nord.Vet.Med. 16, 384 (1964)

9. Dinter,Z., H.J. Hansen und O.Roneus — Untersuchungen über Mucosal Disease; I.Isolierung und Identifizierung des Virus der Virusdiarrhoe. Zbl.Vet.Med. 9, 739 (1962)

1o. Ditschfield,J. und F.W. Doane	The properties and classification of bovine viral diarrhea virus. Canad.J.comp.Med.vet.Sc. 28, 148 (1964)
11. Dutta,S.K.,R.E.Shope und B.S.Pomeroy	Electron microscopic structure of bovine virus diarrhoea virus. Ref.Vet.Bull. 36, 215 (1966)
12. Gillespie,J.H. und J.A.Baker	Studies on virus diarrhea. Cornell vet. 49, 439 (1959)
13. Gillespie,J.H., J.H. Baker und K.McEntee	A cytopathogenic strain of virus diarrhea virus. Cornell vet. 5o, 73 (196o)
14. Gillespie,J.H., L.Coggins,J.Thompson und J.A.Baker	Comparison by neutralization tests of strains of virus isolated from virus diarrhoea and mucosal disease Cornell vet. 51, 155 (1961)
15. Gillespie,J.H.,S.H. Madin und N.B.Darby	Cellular resistance in tissue culture,induced by noncytopathogenic strains, to a cytopathogenic strain of virus diarrhea virus of cattle. Proc.Soc.exp.Bio.Med. 11o,248 (1962)
16. Gillespie,J.H.,S.H. Madin und N.B.Darby	Studies on virus diarrhea virus of cattle, with special reference to its growth in tissue culture and its ether susceptibility. Cornell vet. 53, 276 (1963)
17. Gilette, K.G.	Characterization studies of two strains of bovine viral diarrhea virus. Vet.Bull. 37, 1o2 (1967)
18. Gutekunst,D.E. und W.A.Malmquist	Separation of a soluble antigen and infectious particles of bovine viral diarrhea viruses and their relationship to hog cholera. Canad.J.comp,Med.vet.Sc.27,121 (196

19. Gutekunst, D.E. und W.A. Malmquist — Soluble antigen of bovine viral diarrhea virus; I. Intracellular sythesis, separation and characterization. Arch.ges.Virusforsch. 15, 159 (1965)

20. Gutekunst, D.E. und W.A. Malmquist — Complement-fixing and neutralizing antibody response to bovine viral diarrhea and hog cholera antigens. Canad.J.comp.Med.vet.Sc. 28, 19 (1964)

21. Hansen, H.-J., O.Roneus und Z. Dinter — Untersuchungen über Mucosal Disease; II. Pathologische Anatomie der Krankheit im Vergleich mit dem cytopathogenen Effekt des Virus der Virusdiarrhoe auf die Gewebekultur. Zbl.Vet.Med. 9, 854 (1962)

22. Hermodsson, S. und Z. Dinter — Properties of bovine virus diarrhea virus. Nature 194, 893 (1962)

23. Inaba, Y., T.Omori und T.Kumagai — Detection and measurement of non-cytopathogenic strains of virus diarrhea of cattle by the END method. Arch.ges.Virusforsch. 13, 425 (1963)

24. Kahrs, R.F. — Determination of a 95 per cent antigenic dose for virus diarrhea vaccine. Amer.J.vet.Res. 27 1551 (1966)

25. Kniazeff, A.J., R.A.Huck, W.I.Jarret, W.R.Pritchard, F.K.Ramsey, J.A.Schipper, M.Stöber und B.Liess — Antigenic relationship of some bovine viral diarrhea-mucosal disease viruses from the United States, Great Britain and West Germany. Vet.Record 73, 768 (1961)

26. Lee, K.M. und J.H. Gillespie — Propagation of virus diarrhea virus of cattle in tissue cultur Amer.J.vet.Res. 18, 952 (1957)

27. Malmquist,W.A., A.L.Fernelius und D.E. Gutekunst — Interference of bovine viral diarrhea virus by hog cholera virus in swine kidney cell cultures. Amer.J.vet.Res. 26, 1316 (1965)

28. Mills,J.H.L., S.W. Nielsen und R.E.Luginbuhl — Current status of bovine mucosal disease. J.Amer.vet.Med.Assoc. 148, 691(1965)

29. Olafson,P., A.D.MacCallum und F.H. Fox — An apparently new transmissible disease of cattle. Cornell vet. 36, 2o5 (1946)

3o. Ramsey,F.K. und W.H. Chivers — Mucosal disease of cattle. NorthAmer.Vet. 34, 629 (1953)

31. Schulz, L.Cl. — Pathologisch-anatomische Befunde bei der sog. "Mucosal Disease" (Schleimhautkrankheit) des Rindes. Dtsch.Tierärztl.Wschr. 66, 586 (1959)

32. Stöber,M. — Die klinische Seite der sog. "Mucosal Disease" (Schleimhautkrankheit) des Rindes. Dtsch.Tierärztl.Wschr. 66, 582 (1959)

33. Taylor,D.O.N., D.P.Gustafson und R.M.Claflin — Properties of some viruses of the mucosal disease-virus diarrhea complex. Amer.J.vet.Med. 24, 143 (1963)

34. Tylor, D.E. und F.K. Ramsey — Comparative pathologic, immunologic and clinical responses produced by selected agents of the bovine mucosal disease-virus diarrhea complex. Amer.J.vet.Res. 26, 9o3 (1965)

35. Underdahl,N.R., O.D.Grace und A.B. Hoerlein — Cultivation in tissue culture of cytopathogenic agent from bovine mucosal disease. Proc.Soc.exp.Biol.Med. 94, 795 (1957)

36. Voß, H. — Beobachtung über die Mucosal Disease des Rindes in Deutschland. Dtsch.Tierärztl.Wschr. 66, 149 (1959)

37. Wachendörfer,G. — Zur Diagnose der Mucosal Disease des Rindes mit Hilfe des Agargel-Testes. Dtsch.Tierärztl.Wschr. 72, 413 (1965)

38. Wizigmann,G. und E. Weiß — Über das Auftreten der Mucosal Disease (Virusdiarrhoe) bei Rindern in Bayern. Tierärztl.Umschau 22, 153 (1967)

Herrn Prof. Dr. A. M a y r danke ich herzlich
für die Überlassung des interessanten Themas und
die hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung
der Untersuchungen.

L E B E N S L A U F

Am 29. Juli 1936 wurde ich, Sevim Güneri, als Tochter des Versicherungsdirektors Turgut Güneri und seiner Ehefrau Namika in Sivas, Türkei, geboren.

Nach der Volksschule in Ankara besuchte ich das Gymnasium in Adana/Türkei und beendete dort meine Schulausbildung mit der Abschlußprüfung im Jahre 1955. Anschließend studierte ich 5 Jahre an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Ankara/Türkei und erhielt am 1. August 1960 meine Bestallung als Tierarzt.

Danach arbeitete ich vorübergehend im Laboratorium des Instituts für Bakteriologie in Samsun/Türkei und war dann als Assistentin an der Universität Ankara mit Forschungsarbeiten beschäftigt.

Von Juni bis September 1966 erhielt ich im Goethe-Institut München Unterricht in der deutschen Sprache und weilte anschließend zwei Monate bei einer deutschen Familie in Hamburg.

Seit 2o. Januar 1967 bin ich am Institut für Mikrobiologie und Infektionskrankheiten der Tiere der Universität München mit der Anfertigung meiner Dissertationsarbeit beschäftigt.